

# Università degli Studi di Napoli “Federico II”

Facoltà di Medicina e Chirurgia

Dottorato di Ricerca in  
Morfologia Clinica e Patologica (XIX  
ciclo)

Coordinatore: Prof.ssa Stefania Montagnani



## **Tesi di Dottorato di Ricerca**

Espressione immunoistochimica dei  
principali markers neuroendocrini e di  
SSTR-2A nelle neoplasie neuroendocrine

Relatore  
Prof Stefania Staibano  
Mansueto

Candidata  
Dr Gelsomina

Anno Accademico 2005-2006

## Introduzione

I tumori (neuro) endocrini costituiscono un gruppo di neoplasie che possono svilupparsi in ogni parte dell' organismo.

Originano da cellule con caratteristiche biologiche ed origini embrionali differenti, ma hanno in comune la capacità di produrre ormoni peptidici, ammine regolatrici e differenti mediatori biologici.

I tumori (Neuro)endocrini sono rari (10-20 casi/1.000.000 l'anno) (1). Tuttavia questi dati sono certamente sottostimati a causa di problemi diagnostici e di classificazione che rappresentano il principale ostacolo sia per i clinici che per i patologi.

Esiste infatti una grossa discrepanza tra la prevalenza stimata in base agli esami autoptici e le evidenze cliniche riscontrate.

Recentemente, l'elaborazione di criteri diagnostici uniformi e l'uso di strumenti di diagnosi sempre più efficaci, come la scintigrafia per i recettori della somatostatina e l'endoscopia, permettono una più chiara comprensione di questi fenomeni (2-4).

Nel 1980, la classificazione dei tumori endocrini della WHO (world health organisation) ha applicato la parola carcinoide a tutti i tumori del sistema neuroendocrino, eccetto per quelli delle isole pancreatiche, il carcinoma della tiroide, per il paraganglioma, per il carcinoma polmonare a piccole cellule e per il tumore a cellule di Merkel.

L'abuso di questa terminologia creò confusione tra patologi e clinici, tenendo conto che i grandi progressi fatti dalle tecniche anatomo-patologiche, nei campi biochimici, istochimici ed

immunoistochimici, permettevano di rilevare una grande eterogeneità in questa stessa categoria.

Il termine carcinoide quindi, divenne non più idoneo ad includere neoplasie caratterizzate da profili biologici a comportamento clinico estremamente differenti (5): in pratica, i tumori che avevano la stessa struttura istologica, potevano avere un comportamento biologico differente, suggerendo l'esistenza di sottogruppi (6).

Per queste ragioni, la nuova classificazione adotta il termine “tumore (neuro)endocrino” per tutte le neoplasie con caratteristiche neuroendocrine(7). Tre sono le categorie principali: tumore endocrino benigno ben differenziato; carcinoma endocrino ben differenziato; carcinoma endocrino scarsamente differenziato. Una quarta categoria comprende tumori a doppia componente, endocrina ed esocrina.

La nuova classificazione si basa fondamentalmente sul grado di differenziazione e sull'indice di proliferazione (7, 8).

Una corretta diagnosi anatomo patologica di un tumore (neuro) endocrino non può non prendere in considerazione un convenzionale esame istologico e un esame immunoistochimico (9).

Il convenzionale esame istologico, usando le colorazioni di routine, (ematossilina/eosina) consente, nella maggior parte dei casi un' ipotesi generale di una architettura istologica neuroendocrina, e definisce il grado di differenziazione tumorale e l'indice mitotico, due importanti parametri per la diagnosi e la prognosi del tumore.

Poiché le sindromi funzionali associate ai tumori (neuro)endocrini sono legate alla secrezione di ormoni o mediatori biologici, si deduce che molti tumori sono formati da più di un tipo cellulare. Quindi, la

classificazione dei tumori (neuro)endocrini sulla base del tipo di cellule può dare indicazioni sulla reale biologia del tumore.

L'esame immunoistochimico (10) ha avuto un importante ruolo nella conferma diagnostica e nella successiva caratterizzazione dei tumori (neuro)endocrini, attraverso l'identificazione di un generale o specifico marker neuroendocrino. Esso ha sostituito i tradizionali sistemi istochimici [(Grimelius argirophil reaction (11), oppure Fontana-Masson argentaffin reaction (12)], che sono poco affidabili. I principali markers della differenziazione neuroendocrina sono molecole distribuite su tutte o quasi tutte le normali cellule neuroendocrine e che costituiscono il fenotipo tumorale, includendo le molecole citoplasmatiche come l'enolasi neuronale specifica (NSE) o proteina PGP 9.5, molecole microvescicolari come la sinaptofisina e granulari come le cromogranine(13-16). Specifici markers neuroendocrini corrispondono a diverse sostanze ormonali, polipetidiche e non, prodotte da ciascun tipo di cellula neuroendocrina.

Insieme alla caratterizzazione diagnostica neuroendocrina, l'immunoistochimica ha avuto un importante ruolo non solo nella valutazione della prognosi, ma anche nella predizione delle risposte a specifici agenti terapeutici (17,18). Particolarmente importante è valutare l'indice di proliferazione delle cellule neoplastiche attraverso la quantizzazione percentuale di cellule tumorali positive per Ki-67, antigene espresso durante le fasi G1 e M del ciclo cellulare. Questo indice proliferativo è inversamente correlato alla sopravvivenza (19, 20). La determinazione dell'attività proliferativa consente di

selezionare il trattamento sostitutivo più appropriato ed efficace, riservando la chemioterapia solo a quei tumori (neuro)endocrini con elevato indice proliferativo e che probabilmente risponderanno meglio se trattati con farmaci antitumorali (21, 22). Al contrario i tumori (neuro)endocrini con un basso indice di proliferazione rispondono meno alla chemioterapia e di conseguenza possono rispondere meglio a trattamenti con analoghi della somatostatina o altre molecole biologiche (23-25). Il limite di Ki-67 per distinguere le tre classi principali di tumori (neuro)endocrini, come la nuova classificazione della WHO propone (7), sono: a)  $\leq 2\%$  per i tumori endocrini benigni ben differenziati; b) 3-15% per i carcinomi endocrini ben differenziati e c)  $> 15\%$  per i carcinomi endocrini scarsamente differenziati. I limiti per l'indice mitotico sono:  $\leq 2$  mitosi/10 HPF (high power fields) per i tumori benigni endocrini ben differenziati; b) 3-10 mitosi/10 HPF per i carcinomi ben differenziati e c)  $> 10$  mitosi/10 HPF per i carcinomi endocrini scarsamente differenziati.

Il nostro studio ha avuto diversi obiettivi. Primo fra tutti è stato quello di sottoporre 64 tumori neuroendocrini a revisione istologica e immunoistochimica secondo i criteri della nuova classificazione della WHO, per valutare la sua utilità in campo diagnostico, prognostico, e per le sue potenziali implicazioni cliniche (26). Il secondo obiettivo è stato valutare la espressione del recettore per la somatostatina tipo 2, cercando di approntare uno score affidabile. Sono riportate infatti, in letteratura evidenze nella pratica clinica della presenza dei cinque tipi di recettore per la somatostatina mediante scintigrafia con octiotride

ma, purtroppo, questa tecnica non consente di identificare il tipo e la popolazione cellulare che esprime il sito di legame (cellule tumorali e altri tipi di cellule intratumorali) e, ancora pur essendo in commercio anticorpi specifici per i differenti subtipi, essi non sono validati nella pratica clinica.

Infine, il terzo obiettivo ha previsto che un numero ridotto dei nostri casi, supportato da notizie cliniche e dati strumentali, fosse incluso in uno studio multicentrico al fine di valutare la concordanza tra espressione immunoistochimica di SSTR2 e valori relativi all'octrioscan.

## Materiali e metodi

In questo lavoro sono stati inclusi tutti i tumori con le diagnosi di tumore benigno neuroendocrino, carcinoma neuroendocrino e carcinoide formulata nel dipartimento di Anatomia Patologica dell'Università "Federico II" in un periodo di 4 anni. Il lavoro include 64 tumori.

Per ogni caso è stato selezionato un blocco di paraffina rappresentativo dell'area tumorale da cui sono state tagliate sezioni seriali di 4  $\mu\text{m}$  di spessore. Una sezione è stata colorata con ematossilina/eosina e riesaminata da due patologi indipendenti per confermare la diagnosi originale sulla base di criteri formulati nella classificazione WHO (2000-2004) per i tumori (neuro)endocrini (7). Per ciascun tumore la colorazione immunoistochimica è stata effettuata su sezioni seriali di 4  $\mu\text{m}$  di spessore, montate su un vetrino pretrattato con poly-L-Lysine. Per lo smascheramento dell'antigene le sezioni sono state pretrattate con una tecnica di recupero dell'antigene indotto dal calore, incubandole in un forno a microonde a 650W (tre passaggi sequenziali di 10 minuti ciascuno in 10 Mm buffer citrato pH 6.0). Le sezioni sono state quindi incubate per 20 minuti a temperatura ambiente con 0.3% perossido di idrogeno in metanolo per inattivare le perossidasi endogene, e successivamente lavate in PBS (buffer solfato salino) (Bio-Optica M107, Milan Italy) per 20 minuti. Successivamente le sezioni sono state incubate in siero di mouse non – immune (Dakopatts, Hamburg, Germany) diluito 1:20 in PBS-albumina sierica bovina 1% per 25 minuti per prevenire

segnali specifici. Dopo tre lavaggi in PBS la colorazione è stata eseguita allo scopo di studiare l'espressione di Cromogranina A, Sinaptofisina, Calcitonina, Ki -67, e NSE utilizzando i seguenti anticorpi primari: anti-chromogranine-A (LK2H10 Ventana), anti-synaptophysine (polyclonal 760-2668 Ventana), anti-NSE (BBS/NC/V1-H14 Ventana), anti-calcitonin (polyclonal antibody 036P Biogenex), anti-Ki-67 (K-2 Ventana). L'incubazione è stata eseguita in camere umidificate per 60 minuti.

Per la valutazione del recettore tipo 2 della somatostatina (SSTR2), sono stati testati più cloni di diversa provenienza sia su tessuto pancreatico normale che sulle sezioni allestite dalla inclusione rappresentativa delle lesioni in oggetto (BioTrend, Cologne, Germany, code SS-800; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, code sc-25676; LifeSpan Biosciences, Seattle WA, code LS-A998).

L'anticorpo BioTrend ha dato migliori risultati sia per la localizzazione che per la intensità del segnale. Esso è stato incubato per 4 ore a 37°C.

Dopo l'incubazione con gli anticorpi primari e ulteriori tre cicli di lavaggio in PBS, tutte le sezioni sono state incubate con anticorpi biotinilati e streptavidina marcata con perossidasi (LSAB-HRP, Dako, Italy). Come soluzione substrato cromogeno è stata utilizzata la 3,3 Diaminobenzidina (DAB, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) con  $H_2O_2$  0.3%. In seguito i nuclei sono stati contrastati con ematossilina di Mayer, e le sezioni sono state montate con mezzo sintetico (Entellan, Dermstad, Germany). I controlli positivi per l'espressione degli anticorpi utilizzati sono stati effettuati su sezioni



di tonsilla per Ki-67, di isole pancreatiche per la Cromogranina A, Sinaptofisina, NSE, e SSTR2, e di tiroide per la Calcitonina. I controlli negativi sono stati preparati usando in ciascun caso siero di topo o di coniglio con nessuna specificità di reazione.

L'espressione immunoistochimica di ciascun anticorpo (CromograninaA, Sinaptofisina, NSE) è stata valutata in modo semiquantitativo esaminando campi rappresentativi per ciascun tumore (ingrandimento 400x). L'intensità del segnale è stata classificata come 0 (negativo) 1 (debole), 2 (intermedio) e 3 (forte). Questi numeri sono stati moltiplicati per un numero generato in base alla % di tessuto che mostrava un segnale positivo allo scopo di ottenere un valore con "quickscore test".

Per valutare l'indice di proliferazione è stata misurata la frazione di cellule positive su circa 1000 cellule tumorali esaminate (5 campi di osservazione al microscopio con ingrandimento 400x) la positività all'immunoistochimica era citoplasmatica per i markers neuroendocrini e nucleare per Ki-67.

La valutazione di SSTR2 è stata effettuata in maniera semiquantitativa tenendo conto della intensità e della differente localizzazione del segnale, come segue: score 1 (segnale citoplasmatico puro, sia focale che diffuso); score 2 (segnale di membrana in meno del 50% delle cellule tumorali senza particolare attenzione al segnale citoplasmatico); score 3 (segnale di membrana circonferenziale in più del 50% delle cellule tumorali senza particolare attenzione al segnale citoplasmatico).

I risultati sono stati analizzati da due anatomici patologi, che ignoravano la diagnosi istologica iniziale, in maniera indipendente. Non ci sono state differenze fra i risultati ottenuti da i due anatomici patologi.

#### Analisi statistiche

Per le analisi statistiche, è stato usato il programma SPSS per Windows.

Il test  $\chi^2$  con correzione Yates o il test esatto Fisher è stato usato per vedere le variabili di categoria. La significatività è stata posta per valori di  $p < 0.05$ . I parametri di proliferazione cellulare (indice mitotico e Ki-67) sono stati analizzati attraverso l'analisi ROC (receiver operator characteristic) a determinare i migliori limiti diagnostici per distinguere le neoplasie endocrine ben differenziate dai tumori endocrini scarsamente differenziate e, nell'ambito delle neoplasie ben differenziate, per distinguere i tumori benigni dai carcinomi.

#### Risultati

La rivalutazione istologica e immunoistochimica ha interessato 64 tumori (30 M ; 34 F) con età compresa tra 10 e 82 anni (M=50.9), con differente origine embriologica e anatomica e con una diagnosi iniziale di carcinoide, tumore neuroendocrino benigno, carcinoma neuroendocrino, insulina, feocromocitoma, carcinoma midollare

della tiroide (*Tab. 1a e 1b*). La popolazione studio era così caratterizzata:

- *33 casi con origine neuroectodermica* (pazienti con età tra 10 e 68 anni età media = 43.8 ): 18 Feocromocitomi (10 M ; 8 F Età media 40.5) 15 carcinomi midollari della tiroide (5 M ; 10 F età media 47.7).
- *31 casi con origine endodermica* (pazienti con età compresa tra 30 e 82 anni. Età media 58.5): 10 tumori pancreatici (3 M ; 7 F Età media 50.2); 14 tumori del tratto gastroenterico (9 M ; 5 F. Età media 64.2); 7 tumori di origine diversa (età media 57.9)

## Profilo istologico

La classificazione WHO del 2000 (7) non ha modificato la terminologia e i criteri per la diagnosi istologica dei tumori della midollare del surrene. Pertanto rimane valida, per questi tumori la dizione di feocromocitoma. Questo sottogruppo è, nella maggior parte dei casi (~ 90%) costituito da neoplasie, ad andamento biologico favorevole; tuttavia, mancano dei criteri istologici univoci per identificare un feocromocitoma maligno.

Anche il carcinoma midollare della tiroide non è stato considerato nella classificazione WHO del 2000 ed è tuttora considerato nella classificazione dei tumori tiroidei come appartenente a un sottogruppo con peculiari caratteristiche cliniche e biologiche. Per queste entità, dunque nel nostro lavoro abbiamo usato la stessa terminologia usata in passato (*tavola 2a*). Per quanto riguarda la differenziazione, questi tumori devono essere considerati come carcinomi ben differenziati con una lenta progressione benchè siano stati descritti vari sottogruppi istologici, biologicamente più aggressivi.

Al contrario, i tumori (neuro)endocrini endodermici, che in molti casi originano dal tratto gastroenteropancreatico, sono quelli che hanno maggiormente beneficiato della nuova classificazione. Questa prevede 3 principali categorie uniformi di tumori con differente comportamento e aggressività biologica, indipendentemente dalla sede anatomica e dalle caratteristiche secretorie (*tavola 2b*). I 31 casi in esame, infatti, sono stati aggiornati nella terminologia e parole obsolete o non specifiche come “carcinoide” o “tumore

neuroendocrino”, sono state abbandonate. Essi sono stati distinti in: a) tumori endocrini benigni ben differenziati (12 casi), b) carcinoma endocrino ben differenziato (14 casi), c) carcinomi endocrino scarsamente differenziato (4 casi).

Inoltre, solo un unico caso originante dal colon, è stato riconosciuto come tumore “endocrino – esocrino misto” a causa della presenza di due differenti componenti istologiche: adenocarcinoma e carcinoma endocrino scarsamente differenziato.

In dettaglio, 10 tumori erano pancreatici, 4 gastrici, 3 duodenali, 4 ileali, 3 del colon-retto, 2 polmonari e 2 ovarici. In 3 casi non è stato possibile identificare una sede primitiva del tumore e la diagnosi è stata fatta su tessuto metastatico. Il sottogruppo dei tumori benigni ben differenziati comprendeva 7 tumori pancreatici, 3 tumori duodenali, 1 tumore ileale e un tumore del colon-retto. Il sottogruppo dei carcinomi ben differenziati comprendeva 3 tumori gastrici, 2 tumori pancreatici, 2 tumori ileali, 1 tumore del colon retto, 1 tumore polmonare, 2 tumori ovarici e 3 casi a origine primitiva sconosciuta. Il sottogruppo dei carcinomi scarsamente differenziati comprendeva 1 tumore pancreatico, 1 tumore gastrico, 1 tumore ileale e 1 tumore polmonare.

#### Markers neuroendocrini

Alla immunocolorazione tutti i feocromocitomi sono risultati positivi per Cromogranina A e sinaptofisina, tutti eccetto uno per NSE (94.4%), mentre S-100 è risultato positivo nell’80% dei casi.

Tutti i carcinomi midollari della tiroide sono risultati positivi per calcitonina (100%), mentre NSE è risultato positivo nel 93% dei casi, Cromogranina A nel 80% dei casi e sinaptofisina nel 87%.

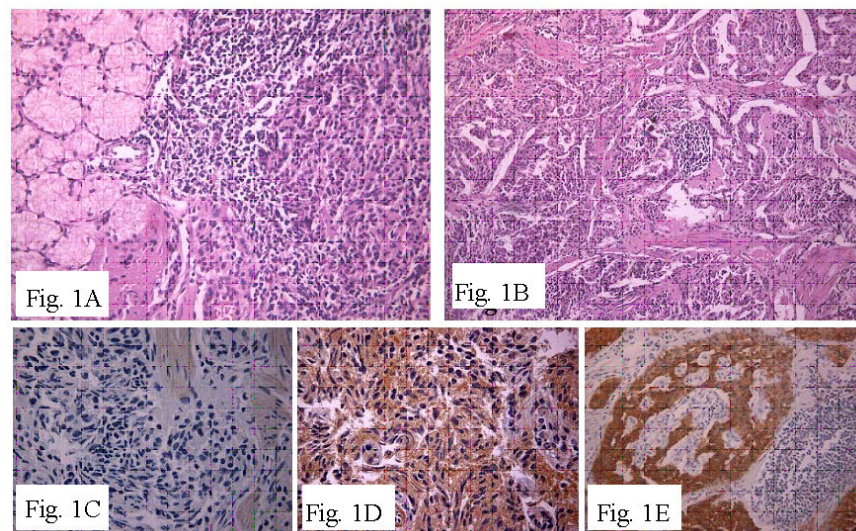
Prendendo in considerazione i tumori gastroenteropancreatici, cromogranina-A e NSE nel 96% dei casi sono risultati positivi e sinaptofisina nel 100% dei casi. Tumori non gastroenteropancreatici sono risultati tutti positivi per sinaptofisina e NSE (100%) e per cromogranina A nel 71% dei casi.

La sede, il grado di differenziazione e l'aggressività biologica influenzano la immunoreattività per i markers neuroendocrini. La Cromogranina A è risultata essere il miglior marker di differenziazione neuroendocrina nei tumori neuroectodermici: il feocromocitoma ha mostrato elevata immunoreattività per Cromogranina A, sinaptofisina e NSE nel 39% 22% e 5% dei casi rispettivamente, mentre il carcinoma midollare della tiroide ha mostrato elevata immunoreattività per Cromogranina A, sinaptofisina e NSE nel 27%, 7 % e 13% dei casi rispettivamente. Le neoplasie pancreatiche si sono rivelate il sottogruppo di tumori neuroendocrini con il più alto grado di immunoreattività per i markers di differenziazione neuroendocrina, tutti ugualmente espressi ad alti livelli: Cromogranina A, sinaptofisina e NSE risultavano altamente espressi nel 70%, 60% e 50% dei casi rispettivamente. Al contrario la Cromogranina A è risultata essere il miglior marker sia in neoplasie gastroenteriche (fig.1) che in tumori non gastroenteropancreatici che mostravano un elevata immunoreattività per Cromogranina A sinaptofisina e NSE

nel 43%, 14% e 21% dei casi e nel 50%, 14% e 14% dei casi rispettivamente.

Se consideriamo il grado di differenziazione, i tumori benigni endocrini ben differenziati mostravano elevata immunoreattività per Cromogranina A, sinaptofisina e NSE nel 59%, 50% e 42% dei casi rispettivamente. I carcinomi endocrini ben differenziati mostravano un elevata immunoreattività di Cromogranina A nel 43% dei casi, e solo il 14% di essi risultava positivo a sinaptofisina e NSE.

Per quanto riguarda i carcinomi endocrini scarsamente differenziati questi hanno mostrato elevata immunoreattività alla sinaptofisina e NSE nel 50% dei casi e solo il 25% è risultato positivo per Cromogranina A .



**Figura 1.** Carcinoma endocrino ben differenziato del duodeno. Il quadro morfologico mostra una popolazione neoplastica aggregata in nidi solidi con architettura trabecolare, modesto pleomorfismo cellulare (A, ematossilina-eosina 250x) e infiltrazione della muscolaris-mucosae ( B, ematossilina-eosina 100x); negatività per citocheratina (C 400x), positività per sinaptofisina e cromogranina A (D, E 400x).

Indici di proliferazione

I risultati riguardo i marker della proliferazione cellulare sono stati i seguenti: 33 casi di tumori neuroectodermici mostravano un indice mitotico compreso tra 1 e 10 mitosi /10 HPF (  $M = 2.4$  mitosi HPF ) e Ki- 67 tra 0 e 4% ( $M = 1.3\%$ ); 31 casi di tumore a origine endodermica mostravano un indice mitotico compreso tra 0 e 30 mitosi /10 HPF ( $M = 2.9$  mitosi HPF) e Ki- 67 tra 1 e 80% (  $M = 8\%$  ).

In particolare, nei feocromocitomi, Ki-67 risultava compreso fra 1 e 4% ( $M = 1.5\%$ ) con un indice mitotico compreso tra 1 e 10 mitosi/ 10 HPF ( $M = 2.7$  mitosi/10 HPF). Uno dei casi mostrava un Ki-67 = 4% associato ad un indice mitotico uguale a 10 mitosi/10HPF. Questo caso inoltre, mostrava molte atipie cellulari, necrosi ed elevate dimensioni. Queste caratteristiche sono tutte associate a caratteristiche biologiche aggressive (tabella 2a).

Nei carcinomi midollari della tiroide Ki-67 era compreso tra 0 e 3% ( $M = 1.1\%$ ) con un indice mitotico compreso tra 1 e 4 mitosi/10 HPF ( $M = 2.1$  mitosi/10 HPF).

Fra i tumori gastroenteropancreatici 10 originavano dal pancreas. Questi mostravano un Ki-67 compreso fra 2 e 25 (  $M = 4.0\%$  ) e un indice mitotico compreso fra 1 e 6 mitosi /10 HPF (  $M = 2.7$  mitosi/10 HPF; 3 di questi sono stati inizialmente classificati come “tumori neuroendocrini atipici”, e fra questi 1 aveva Ki-67 = 6 % che suggeriva che fosse un carcinoma endocrino ben differenziato, mentre gli altri due, con Ki-67 1% e 2% rispettivamente erano tumori endocrini benigni ben differenziati. Inoltre un altro caso di tumore

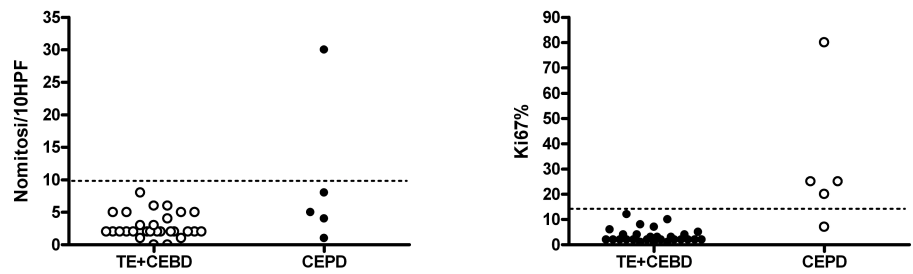


pancreatico mostrava un Ki-67 uguale al 25% ed è stato pertanto classificato come carcinoma endocrino scarsamente differenziato.

I tumori del tratto gastroenterico erano 14 con Ki-67 compreso tra 1 e 80% (M=9.8%) e un indice mitotico compreso tra 0 e 30 mitosi / 10 HPF ( M = 4.3 mitosi/10 HPF). Tra questi 2 tumori, riclassificati come carcinomi endocrini scarsamente differenziati mostravano Ki-67 uguale a 2% e 75% rispettivamente e un altro, riclassificato come tumore endocrino-esocrino misto mostrava Ki-67 uguale 80%.

I tumori non-gastroenteropancreatici avevano Ki-67 compreso fra 2 e 25% ( M=9.4%) e un indice mitotico compreso tra 2 e 8 mitosi/10 HPF ( M = 4.4 mitosi/10HPF).

Gli indici di proliferazione sono stati valutati in relazione al grado di differenziazione istologica dei tumori ( tumori benigni ben differenziati, carcinomi ben differenziati, carcinomi scarsamente differenziati) mediante l'utilizzo dell'analisi ROC . Il limite di Ki-67 associato alla migliore sensibilità (80%) e specificità (100%) per distinguere neoplasie endocrine ben differenziate ( tumori benigni e carcinomi) dai carcinomi endocrini scarsamente differenziati ( includendo anche i tumori misti aventi componente endocrina scarsamente differenziata) è stato fissato come uguale a 15% (p = 0.001 ) (fig.2).



**Fig.2** distribuzione delle neoplasie ben differenziate (tumori benigni e carcinomi) e dei carcinomi endocrini scarsamente differenziati sulla base dell'indice mitotico (cut-off: >10 mitosi / 10 HPF) e di Ki-67 (cut-off: >15%).

Nessun cut-off statisticamente significativo ha permesso di distinguere tumori endocrini ben differenziati da quelli scarsamente differenziati sulla base dell'indice mitotico. Un cut-off di 10 mitosi /10 HPF (come proposto nella classificazione dei tumori endocrini della WHO del 2000 per distinguere le neoplasie ben differenziate da quelle scarsamente differenziate) classifica come tumore ad elevato indice mitotico ( > cut-off ) un tumore istologicamente definito come tumore endocrino- esocrino misto con una componente di carcinoma endocrino scarsamente differenziato, mentre classifica in maniera sbagliata come tumori a basso indice mitotico ( < cut-off ) tutti e 4 i tumori istologicamente definiti come carcinomi endocrini scarsamente differenziati.

Fra i tumori benigni ben differenziati e carcinomi ben differenziati l'attribuzione di un cut-off per Ki-67 = 2.5 % ha consentito di distinguere significativamente i tumori benigni dai

In particolare, 4 casi, classificati come carcinomi endocrini ben differenziati, mostravano un Ki-67 = 2% ed un caso classificato come tumore endocrino benigno ben differenziato aveva un Ki-67= 3%. Per quanto riguarda l'indice mitotico un cut-off il cui valore era compreso fra 2 e 3 mitosi/10 HPF ha distinto tra le 2 categorie con una sensibilità del 60% ed una specificità del 100% (p= 0.006).

The figure consists of two dot plots. The left plot shows the 'indice mitotico NO./10HPF' (mitotic index NO./10HPF) on the y-axis, ranging from 0 to 8. The x-axis has two categories: 'TEBD' and 'CEBD'. For TEBD, there are 10 data points (open circles) mostly clustered around 2.0, with one outlier at 3.0. For CEBD, there are 10 data points (filled circles) showing a wider distribution, with values ranging from 2.0 to 6.0. A dashed horizontal line is drawn at approximately 2.4. The right plot shows 'Ki67 %' on the y-axis, ranging from 0.0 to 20.0. The x-axis has two categories: 'TEBD' and 'CEBD'. For TEBD, there are 10 data points (open circles) mostly clustered around 2.5%. For CEBD, there are 10 data points (filled circles) showing a wider distribution, with values ranging from 2.5% to 12.5%. A dashed horizontal line is drawn at approximately 2.5%.

Le revisioni istologiche e immunoistochimiche hanno consentito un significativo cambiamento nella diagnosi di 10 casi di tumori endodermici su 31 (32%) (table 3). In 2 casi con diagnosi

iniziale di adenocarcinoma con parziale morfologia e differenziazione neuroendocrina originante dall'apparato digerente, la rivalutazione istologica ha consentito di diagnosticare un carcinoma endocrino scarsamente differenziato e un tumore endocrino-esocrino misto.

In 8 casi, la revisione istologica ha consentito di riclassificare le diagnosi di tumore neuroendocrino in un sottogruppo differente da quello suggerito dalle diagnosi iniziali. In 4 casi il nuovo sottogruppo è stato caratterizzato da prognosi peggiore e in 4 casi prognosi migliori.

I 4 casi che hanno mostrato una prognosi migliore dopo la revisione avevano la loro origine nell'ileo (2 casi), duodeno (1 caso) e pancreas (1 caso). Tre tumori neuroendocrini atipici sono stati riclassificati come tumori endocrini benigni ben differenziati con Ki-67 tra 1 e 2% e indice mitotico = 2 mitosi/10 HPF. Un carcinoma endocrino di basso grado è stato rivalutato come tumore endocrino benigno ben differenziato con un Ki-67 = 2% e indice mitotico = 0 mitosi/ 10 HPF. I 4 riclassificati con prognosi peggiore avevano la loro origine nell'ileo (1 caso), nel pancreas (1 caso) e nelle ovaie (2 casi). Due tumori neuroendocrini dell'ileo e del pancreas sono stati rivalutati come carcinomi endocrini scarsamente differenziati con un Ki-67 = 20% e 25% rispettivamente e un indice mitotico = 5 mitosi/10 HPF e 4 mitosi /10 HPF, rispettivamente. Due tumori inizialmente classificati come carcinoidi ovarici sono stati rivalutati come carcinomi endocrini ben differenziati, con un Ki-67 = 12 % e 8% rispettivamente e un indice mitotico = 2 mitosi/ 10 HPF per entrambi.

Il valore di Ki-67 di tutti i casi riclassificati rientrava entro il range per la categoria istologica di differenziazione, mentre, in 6 dei 10 casi, il valore dell'indice mitotico non rientrava entro il range per la categoria istologica di differenziazione (60%).

#### SSTR-2A

In accordo con lo score applicato, i risultati sono stati i seguenti: 7 casi sono risultati negativi (score 0), 24 casi hanno mostrato una positività citoplasmatica (score 1), 17 casi hanno mostrato una positività di membrana in meno del 50% delle cellule neoplastiche (score 2), 14 casi hanno mostrato una positività circonferenziale di membrana nel più del 50% delle cellule neoplastiche.

SSTR-2A è stato quindi evidenziato in 31 casi (tab. 4).

## Discussione

I risultati di questo studio mostrano che la nuova classificazione WHO per i tumori endocrini è di grande importanza nelle diagnosi delle patologie tumorali a carattere neuroendocrino perché di facile interpretazione e perché consente di uniformare tutte le diagnosi non considerando la sede, l'origine embriologica e le caratteristiche secretorie dei tumori, abbandonando termini obsoleti e fuorvianti per un corretto approccio clinico-terapeutico.

Partendo dalla prima descrizione di Oberdofer dei “ tumori carcinoidi” del 1907 (27), la classificazione dei tumori (neuro)endocrini è passata, durante gli anni, attraverso numerose revisioni differenti che non hanno realmente aggiunto nuovi elementi se paragonate alle prime descrizioni (28). Negli ultimi 20 anni, gli studi sul sistema (neuro)endocrino e sui tumori originanti da esso hanno cominciato a riportare qualcosa di nuovo, grazie all'identificazione di molecole molto importanti come i recettori per le cromogranine, e i recettori per la somatostatina e grazie alle grandi possibilità offerte dalle tecniche di immuno-istochimica nel riconoscere queste molecole, espresse dalle cellule neuroendocrine differenziate, nei tessuti biologici (29).

È stata pertanto proposta una classificazione di tumori neuroendocrini, adesso usata dalla WHO, basata sia su criteri istologici quali la morfologia neuroendocrina , le caratteristiche del nucleo, la presenza o assenza di necrosi e indice mitotico, ma anche

sull'ampio uso dell'immunoistochimica per evidenziare i markers di differenziazione neuroendocrina e gli indici di proliferazione cellulare.

La divisione dei tumori in 3 categorie corrispondenti a differenti gradi di differenziazione istologica e a differenti comportamenti biologici offre un immediata comprensione dell'aggressività dei tumori, della prognosi e delle possibilità terapeutiche potenzialmente efficaci.

Benchè questa nuova classificazione sia stata validata solo per i tumori (neuro)endocrini ad origine gastroenteropancreatica, essa può essere estesa in modo efficace ad altre categorie di tumori (neuro)endocrini i quali, al momento, sono ancora inclusi in schemi di classificazione separati specifici per la sede di origine del tumore.

E' questo il caso dei tumori (neuro)endocrini polmonari, che non sono inclusi nella classificazione dei tumori (neuro)endocrini del (7), ma che sono mantenuti nella classificazione dei tumori polmonari come un sottogruppo costituito da 4 categorie di tumori (neuro)endocrini: carcinoide tipico, carcinoide atipico, carcinoma (neuro)endocrino a grandi cellule e carcinoma (neuro)endocrino a piccole cellule (30). Questa classificazione non è completamente sovrapponibile alla classificazione del 2000 (7), specialmente per quanto riguarda la terminologia che ancora usa termini come carcinoide. Inoltre, nell'ambito dei tumori (neuro)endocrini polmonari di alto grado, ci sono 2 sottogruppi distinti, a piccole-cellule ed a grandi-cellule, che rappresentano, invece, una singola entità nella classificazione dei tumori (neuro)endocrini. Ad ogni

modo, la più importante limitazione della classificazione dei tumori (neuro)endocrini polmonari è l'uso dell'indice mitotico come principale strumento istologico per predire l'aggressività biologica dei tumori (31). Il primo tentativo di inserire in un unico gruppo tutti i tumori (neuro)endocrini polmonari e quelli gastroenteropancreatici è stato fatto da Capella (6); nel suo studio, l'autore ha proposto una classificazione di tumori (neuro)endocrini polmonari, pancreatici e dell'intestino in 3 sottogruppi principali: comportamento benigno, basso e alto grado di malignità, con un eventuale quarto sottogruppo per definire i tumori pancreatici e intestinali con comportamento intermedio fra quelli benigni e quelli con basso grado di malignità. Lo stesso autore precisa che la sua classificazione lascia aperte alcune aree di discussione e molte incertezze ma, come egli dichiara, acquisizione continua di nuove conoscenze in questo campo rende necessaria una nuova rivalutazione che sarebbe utile per avere un punto di vista completo su questi tumori. Sfortunatamente, questo tentativo non ha avuto seguito, e ancora oggi i tumori (neuro)endocrini polmonari come quelli del timo, della tiroide e della midollare del surrene seguono peculiari criteri di classificazione (7, 32, 33).

Per quanto concerne i tumori (neuro)endocrini della tiroide e della midollare del surrene, ora definiti come carcinoma midollare della tiroide e feocromocitoma rispettivamente, questi due sottogruppi mancano di criteri istologici e immunoistochimici che consente di predire l'aggressività biologica (34, 35).



Molto importante per le implicazioni terapeutiche e prognostiche è la valutazione del Ki-67 e dell'indice mitotico; tumori a lenta-evoluzione che mostrano bassa espressione di Ki-67 e un basso indice mitotico saranno più utilmente trattati con molecole biologiche. Infatti gli indici di proliferazione hanno un'inversa correlazione con il grado di differenziazione neuroendocrina. Una simile tendenza è stata dimostrata anche in questo studio, dove i tumori benigni ben differenziati mostrano una più alta espressione dei markers neuroendocrini, con qualche variabilità dipendente dalla sede, mentre tumori scarsamente differenziati perdono parzialmente l'espressione dei markers neuroendocrini più specifici come la cromogranina A e la sinaptofisina.

Perciò, tumori con basso indice di proliferazione esprimeranno elevati livelli di markers neuroendocrini, come i recettori della somatostatina e risponderanno, di conseguenza, meglio al trattamento con analoghi della somatostatina.

Al contrario, neoplasie con un'alta espressione di Ki-67 e alto indice mitotico, potranno essere trattate più utilmente con chemioterapici, anche in caso essi mostrino solo una presentazione locale e non metastatica.

La rivalutazione immunoistochimica consente di aggiungere nuovi elementi, utili per la prognosi, non solo per i tumori gastroenteropancreatici, ma anche per i feocromocitomi ed i carcinomi midollari della tiroide; infatti, un alto indice di Ki-67, sembra consentire l'identificazione, anche in questi due sottogruppi, di

tumori più aggressivi che, di conseguenza, otterranno maggiori benefici da trattamenti più aggressivi.

I risultati di questo studio hanno evidenziato l'esistenza di un sottogruppo di tumori con un  $Ki-67 = 2\%$  ma con una diagnosi istologica di carcinoma ben differenziato. Tale discordanza sembra ridurre il valore prognostico di Ki-67.

Ad ogni modo, precedenti osservazioni indicano un ruolo predominante dell'indice di proliferazione tumorale, espresso come Ki-67, comparso nelle valutazioni delle caratteristiche istologiche e citologiche del tumore nella distinzione tra la neoplasia endocrina benigna ben differenziata, dell'"intestino intermedio" o di origine sconosciuta, di differente aggressività (8, 36, 37). Da questo punto di vista, i 4 casi di carcinoma endocrino ben differenziato, che mostrano  $Ki-67 = 2\%$  (< cut-off che separa tumori benigni ben differenziati dai carcinomi) potrebbero essere interpretate come neoplasie neuroendocrine con comportamento benigno, considerando l'indice di proliferazione. Naturalmente, queste ipotesi devono essere convalidate da studi che valutano il ruolo prognostico di Ki-67 nella sopravvivenza.

Altro importante aspetto di questo lavoro è il confronto tra i due diversi indici di proliferazione: Ki-67 e indice mitotico. Infatti prendendo in considerazione la distinzione tra neoplasie ben differenziate (tumori e carcinomi) e neoplasie scarsamente differenziate, Ki-67 si correla sensibilmente meglio dell'indice mitotico con la diagnosi istologica e con il grado di differenziazione. In particolare, in 4 carcinomi ben differenziati viene attribuito

inappropriatamente un indice mitotico indicante un basso indice proliferativo, mentre il Ki-67 attribuisce loro un appropriato punteggio di  $> 15\%$ .

Riguardo la distinzione tra i tumori endocrini benigni ben differenziati e carcinomi endocrini ben differenziati, i 2 indici di proliferazione correlano ugualmente bene con le diagnosi istologiche e con il grado di differenziazione sulla base dei valori del cut-off  $\leq 2\%$  per Ki-67 e  $\leq 2$  mitosi/10 HPF, come suggerito dalle analisi-ROC.

Il primo risultato di questo lavoro è l'uso dei nuovi criteri di classificazione basati sulla valutazione del grado di differenziazione, dell'espressione dei markers neuroendocrini e degli indici di proliferazione cellulare che hanno portato verso una nuova classificazione delle diagnosi nel 34% dei casi con molti vantaggi per una corretta valutazione prognostica della malattia e per la scelta di una strategia terapeutica più appropriata.

Il secondo e sicuramente più intrigante risultato è stato valutare la espressione immunoistochimica del recettore per la somatostatina tipo 2 approntando un sistema di score, come metodo semplice, economico e mirato nel profilo delle neoplasie neuroendocrine. Dal nostro studio emerge che uno score 2 e uno score 3 sono presenti nei tumori neuroendocrini ben differenziati e nei carcinomi neuroendocrini ben differenziati quando comparati con i carcinomi scarsamente differenziati. Inoltre, una consistente concordanza è stata osservata tra valori alla scintigrafia con octiotride e forme ben

differenziate e scarsamente differenziate contrariamente alla bassa concordanza osservata nei carcinomi midollari della tiroide.

In conclusione, l'esame istologico e immunoistochimico dei tumori (neuro)endocrini non può prescindere dalla valutazione del grado di differenziazione, dell'espressione di markers neuroendocrini e degli indici di proliferazione cellulare. La WHO classificazione fornisce un criterio uniforme e riproducibile per le diagnosi indipendentemente dalla sede anatomica, origine embriologica, e l'attività secretiva e nello stesso tempo rappresenta uno strumento valido ed efficace insieme con la valutazione dei recettori per la somatostatina, allo stato attuale ma in futuro si spera sempre di più molecole, per il clinico per caratterizzare il profilo biologico, predire le prognosi e scegliere la miglior strategia terapeutica.

**Tabella 1a: Popolazione dello studio**

N°	Age	Sex	Initial diagnosis	Seat	Histological material	CgA	SYN	NSE
1	19	M	Pheocromocitoma	Adrenal	Adrenal			
2	66	M	Pheocromocitoma	Adrenal	Adrenal	pos		
3	30	M	Pheocromocitoma	Adrenal	Adrenal	pos		
4	62	M	Pheocromocitoma	Adrenal	Adrenal	pos		
5	54	F	Pheocromocitoma	Adrenal	Adrenal	pos		
6	26	F	Pheocromocitoma	Adrenal	Adrenal + splees	pos	pos	neg
7	22	M	Pheocromocitoma	Adrenal	Adrenal			
8	61	M	Pheocromocitoma	Adrenal	Adrenal	pos		
9	38	F	Pheocromocitoma	Adrenal	Adrenal			
10	25	M	Pheocromocitoma	Adrenal	Adrenal	pos		
11	52	F	Pheocromocitoma	Adrenal	Adrenal	pos		
12	29	F	Pheocromocitoma	Adrenal	Adrenal			
13	66	M	Pheocromocitoma	Adrenal	Adrenal	pos	pos	pos
14	21	F	Pheocromocitoma	Adrenal	Adrenal + limphonodes			
15	59	M	Pheocromocitoma	Adrenal	Adrenal	pos		
16	66	F	Pheocromocitoma	Adrenal	Kidney and spleen	pos	pos	pos
17	10	F	Pheocromocitoma	Adrenal	Soft tissues	pos		pos
18	23	M	Pheocromocitoma	Adrenal	Adrenal	pos		
19	56	F	Medullary thyroid carc.	Thyroid	Thyroid + lymphonodes	pos		pos
20	19	F	Medullary thyroid carc.	Thyroid	Thyroid + lymphonodes			
21	60	F	Medullary thyroid carc.	Thyroid	Thyroid			pos
22	65	F	Medullary thyroid carc.	Thyroid	Thyroid			
23	42	F	Medullary thyroid carc.	Thyroid	Lymphnode			
24	21	F	Medullary thyroid carc.	Thyroid	Thyroid + lymphonodes			
25	59	M	Medullary thyroid carc.	Thyroid	Thyroid + lymphonodes			
26	68	M	Medullary thyroid carc.	Thyroid	Thyroid			
27	42	F	Medullary thyroid carc.	Thyroid	Lymphnode			
28	57	F	Medullary thyroid carc.	Thyroid	Thyroid + lymphonodes			
29	62	M	Medullary thyroid carc.	Thyroid	Thyroid			
30	36	F	Medullary thyroid carc.	Thyroid	Thyroid			
31	39	F	Medullary thyroid carc.	Thyroid	Thyroid			
32	42	M	Medullary thyroid carc.	Thyroid	Thyroid + lymphonodes	pos	pos	pos
33	48	M	Medullary thyroid carc.	Thyroid	Lymphnode	pos		

**Tabella 1b: popolazione dello studio**

N°	Age	Sex	Initial diagnosis	Seat	Histological material	CgA	SYN	NSE
34	33	F	Atypical neuroendocrine tumour	Pancreas	Pancreas	P	P	P
35	66	F	Insulinoma	Pancreas	Pancreas	P		P
36	66	F	Insulinoma	Pancreas	Pancreas			
37	43	F	Neuroendocrine tumour	Pancreas	Pancreas		P	
38	60	M	Neuroendocrine carcinoma	Pancreas	Pancreas	P	P	P
39	76	M	Insulinoma	Pancreas	Pancreas	P	P	P
40	42	F	Atypical neuroendocrine tumour	Pancreas	Pancreas + limph.	P	P	P
41	38	M	Insulinoma	Pancreas	Pancreas	P	P	N
42	48	F	Neuroendocrine tumour	Pancreas	Hepatic biopsy	P	P	P
43	30	F	Atypical neuroendocrine tumour	Pancreas	Pancreas	P		
44	51	F	Differentiated endocrine neoplasm	Duodenum	Duodenum			
45	47	F	Malignant neuroendocrine tumour	Duodenum	Duodenum	N	P	P
46	65	M	Neuroendocrine carcinoma	Stomach	Stomach + limph.	P	P	P
47	64	M	Neuroendocrine carcinoma	Stomach	Stomach		P	P
48	73	M	Neuroendocrine carcinoma	Stomach	Biopsy		P	P
49	82	F	Endocrine adenocarcinoma	Stomach	Biopsy	P	N	P
50	47	F	Low grade neuroendocrine ca.	Duodenum	Biopsy			
51	67	M	Atypical endocrine carcinoma	Gut	Liver + omentum	P	P	P
52	66	M	Neuroendocrine tumour	Gut	Gut			
53	72	M	Neuroendocrine carcinoma	Colon	Biopsy		P	P
54	75	M	Neuroendocrine carcinoma	Ileum	Ileum + limph.	P	P	P
55	53	M	Neuroendocrine carcinoma	Ileum	Ileum + limph.	P	P	P
56	69	F	Endocrine adenocarcinoma	Sigma	Sigma	P	P	P
57	68	M	Carcinoid	Rectum	Rectum	P	P	P
58	78	M	Neuroendocrine carcinoma	tonsill	fragments	N	P	P
59	48	F	Atypical carcinoid	Lung	Lung	P		P
60	75	M	Small cell carcinoma	Lung	Lymphonodes	P	N	P
61	30	M	Metastasis by neuroend carcinoma	?	Bone	N	N	
62	69	F	Carcinoid	Ovary	Pelvic mass	P		P
63	66	F	Carcinoide	Ovary	Ovary			
64	48	F	Neuroendocrine carcinoma	?	Liver			

**P Positive**

**N Negative**

N°	Age	Sex	Primitive Tumour	WHO 2000 Diagnosis	Size (cm)	Necrosis	Atypia grade	Mitotic rate	CgA	SYN	NSE	Ki67 (%)
1	19	M	Adrenal	Pheocromocytoma	6.0	Yes	Slight	1	2	1	2	2
2	66	M	Adrenal	Pheocromocytoma	4.0	No	Slight	2	3	2	2	1
3	30	M	Adrenal	Pheocromocytoma	6.5	Yes	Moderate	5	2	2	2	2

4	62	M	Adrenal	Pheocromocytoma	4.5	Yes	Severe	2	3	3	2	2
5	54	F	Adrenal	Pheocromocytoma	3.0	No	Lieve	2	2	3	2	1
6	26	F	Adrenal	Pheocromocytoma	14	Yes	Severe	5	2	1	0	1
7	22	M	Adrenal	Pheocromocytoma	5.0	No	Slight	2	2	1	1	1
8	61	M	Adrenal	Pheocromocytoma	3.5	No	Moderate	2	2	1	1	1
9	38	F	Adrenal	Pheocromocytoma	7.0	Yes	Moderate	2	1	1	1	2
10	25	M	Adrenal	Pheocromocytoma	5.7	No	Moderate	2	3	2	2	2
11	52	F	Adrenal	Pheocromocytoma	7.9	No	Severe	2	3	1	1	1
12	29	F	Adrenal	Pheocromocytoma	6.0	No	Moderate	1	3	2	2	1
13	66	M	Adrenal	Pheocromocytoma	5	No	Severe	2	3	2	2	1
14	21	F	Adrenal	Pheocromocytoma	4.5	Yes	Severe	2	2	2	1	2
15	59	M	Adrenal	Pheocromocytoma	6.8	No	Moderate	2	2	2	3	2
16	66	F	Adrenal	Pheocromocytoma	11	Yes	Severe	10	1	2	1	4
17	10	F	Adrenal	Pheocromocytoma	2	No	Moderate	2	3	3	2	1
18	23	M	Adrenal	Pheocromocytoma	6	No	Severe	2	2	3	2	1
19	56	F	Thyroid	Med. thyroid carc	4.5	No	Slight	2	3	2	3	0
20	19	F	Thyroid	Med. thyroid carc	1.8	No	Slight	2	0	0	1	1
21	60	F	Thyroid	Med. thyroid carc	1	No	Slight	2	0	1	3	0
22	65	F	Thyroid	Med. thyroid carc	3.8	No	Slight	2	2	2	2	2
23	42	F	Thyroid	Med. thyroid carc	2.5	No	Slight	2	2	2	1	1
24	21	F	Thyroid	Med. thyroid carc	1.5	No	Slight	2	1	1	1	0
25	59	M	Thyroid	Med. thyroid carc	2	No	Slight	2	2	2	2	2
26	68	M	Thyroid	Med. thyroid carc	1	No	Slight	2	3	3	2	2
27	42	F	Thyroid	Med. thyroid carc	0.8	No	Slight	1	2	1	1	1
28	57	F	Thyroid	Med. thyroid carc	2	No	Moderate	2	3	2	2	0
29	62	M	Thyroid	Med. thyroid carc	1	No	Moderate	2	0	1	1	0
30	36	F	Thyroid	Med. thyroid carc	1.8	No	Slight	2	3	2	2	1
31	39	F	Thyroid	Med. thyroid carc	2	No	Moderate	2	1	0	1	0
32	42	M	Thyroid	Med. thyroid carc	1.2	No	Moderate	2	1	1	1	3
33	48	M	Thyroid	Med. thyroid carc	1.8	Yes	No	4	1	1	2	3

**Tabella 2a: rivalutazione diagnostica**

**Tabella 2b: rivalutazione diagnostica**

N°	Age	Sex	Primitive tumour	WHO 2000 diagnosis	Size (cm)	Necrosis	Grade of atypia	Mitotic rate	CgA	SIN	NSE	Ki67 (%)
34	33	F	Pancreas	WDET	2.5	No	Slight	2	3	3	3	2
35	66	F	Pancreas	WDET	3	No	Slight	2	3	3	3	2
36	66	F	Pancreas	WDET	2	No	Slight	2	2	3	2	2
37	43	F	Pancreas	WDET	2	No	Moderate	2	3	2	2	2
38	60	M	Pancreas	WDEC	1.8	No	Moderate	4	3	3	2	3
39	76	M	Pancreas	WDET	1	No	Slight	2	2	2	2	2
40	42	F	Pancreas	WDET	2	No	Moderate	2	3	3	3	1
41	38	M	Pancreas	WDET	2.2	No	No	1	3	2	0	1
42	48	F	Pancreas	PDEC	4	No	Slight	4	2	3	3	25
43	30	F	Pancreas	WDEC	4	No	Moderate	6	2	2	2	6
44	51	F	Duodeno	WDET	1	No	No	2	1	2	1	3
45	47	F	Duodeno	WDET	0.8	No	Moderate	2	0	3	3	2
46	65	M	Stomaco	WDEC	1.2	Yes	Moderate	0	3	3	3	5
47	64	M	Stomaco	WDEC	1	No	Moderate	3	2	2	2	3
48	73	M	Stomaco	WDEC	1.5	Yes	Slight	5	1	1	1	4
49	82	F	Stomaco	PDEC	0.8	No	Slight	1	3	2	1	7
50	47	F	Duodeno	WDET	0,8	No	Slight	0	3	2	2	2
51	67	M	Ileum	WDET	2	No	Slight	2	3	3	3	2
52	66	M	Ileum	PDEC	9	Yes	Severe	5	2	2	2	20
53	72	M	Colon	WDEC	1.5	No	Slight	2	3	2	3	2
54	75	M	Ileum	WDEC	2.5	No	Slight	2	1	1	1	4
55	53	M	Ileum	WDEC	1.4	No	Slight	5	3	2	2	2
56	69	F	Colon	MEET	2.5	No	Moderate	30	1	1	1	80
57	68	M	Rectum	WDET	0.5	No	No	1	1	2	1	1
58	78	M	Unknown	WDEC	-	No	Slight	3	0	1	1	2
59	48	F	Lung	WDEC	4.5	No	Moderata	6	3	2	1	7
60	75	M	Lung	PDEC	2.5	Yes	Severe	8	2	3	3	25
61	30	M	Unknown	WDEC	-	No	Moderate	5	2	1	1	10
62	69	F	Ovary	WDEC	15	No	Slight	2	3	1	1	12
63	66	F	Ovary	WDEC	10	No	Slight	2	2	2	1	8
64	48	F	Unknown	WDEC	-	No	Moderate	5	0	2	2	2

*WDET: well differentiated endocrine tumour; WDEC: well differentiated endocrine carcinoma; PDEC: poorly differentiated endocrine carcinoma; MEET: mixed endocrine-exocrine tumour*



**Tab.3: rivalutazione con la nuova classificazione**

<i>Initial diagnosis</i>	<i>Re-evaluated diagnosis</i>	<i>M.R.</i>	<i>Ki67</i>
<b>Neuroendocrine diagnosis</b>			
Endocrine adenocarcinoma	Poorly differentiated endocrine carc.	1	7
Endocrine adenocarcinoma	Mixed endocrine-exocrine tumour	3	80
<b>Better prognosis</b>			
Neuroendocrine atypical tumour	Well differentiated endocrine tumour	2	2
Neuroendocrine atypical tumour	Well differentiated endocrine tumour	2	1
Neuroendocrine atypical tumour	Well differentiated endocrine tumour	2	2
Low grade neuroendocrine ca.	Well differentiated endocrine tumour	0	2
<b>Worse prognosis</b>			
Tumore neuroendocrino	Poorly differentiated endocrine carc.	5	20
Tumore neuroendocrino	Poorly differentiated endocrine carc.	4	25
Carcinoide	Well differentiated endocrine carcinoma	2	12
Carcinoide	Well differentiated endocrine carcinoma	2	8

**Tab. 4: IHC SST-R2A**

	IHC negativa SST-R2A		IHC positiva SST-R2A	
	Score 0	Score 1	Score 2	Score 3
18 Pheocrom.	0	9	9	0
15 Med. thyroid	4	10	0	1
10 Pancreas WDET/WDEC/PDEC	1	1	2	6
GI				
11 WDET/WDEC	1	0	5	6
2 PDEC	0	2	0	0
Lung				
WDEC			1	
PDEC		1		
3 WDEC unknown	1	1		1

WDET: well differentiated neuroendocrine tumor; WDEC:well differentiated neuroendocrine carcinoma; PDEC: poorly differentiated neuroendocrine carcinoma

## Bibliografia

1. Taal BG, Visser O.

Epidemiology of neuroendocrine tumours. *Neuroendocrinology*. 80 Suppl 1:3-7, 2004.

2. Anthony LB, Martin W, Delbeke D, Sandler M

Somatostatin receptor imaging: predictive and prognostic considerations. *Digestion* 57 Suppl 1:50-3, 1996

3. Bombardieri E, Maccauro M, De Deckere E, Savelli G, Chiti A.

Nuclear medicine imaging of neuroendocrine tumours. *Ann Oncol*;12 Suppl 2:S51-61, 2001. Review.

4. Gibril F, Reynolds JC, Doppman JL, *et al.*

Somatostatin receptor scintigraphy: its sensitivity compared with that of other imaging methods in detecting primary and metastatic gastrinomas. A prospective study. *Ann Intern Med*. Jul 1;125(1):26-34, 1996.

5. DeLellis RA, Dayal Y, Wolfe HJ.

Carcinoid tumors. Changing concepts and new perspectives. *Am J Surg Pathol*. Apr;8(4):295-300, 1984.

6. Capella C, Heitz PU, Hofler H, Solcia E, Kloppel G.

Revised classification of neuroendocrine tumours of the lung, pancreas and gut. *Virchows Arch*.;425(6):547-60, 1995. Review.

7. Solcia E, Klöppel G, Sobin L.H.

Histological Typing of Endocrine Tumours. World Health Organization  
International Histological Classification of Tumours. Springer-Verlag Berlin  
Heidelberg New York, Second Edition 2000.

8. Pelosi G, Bresaola E, Bogina G *et al.*

Endocrine tumors of the pancreas: Ki-67 immunoreactivity on paraffin sections is an independent predictor for malignancy: a comparative study with proliferating-cell nuclear antigen and progesterone receptor protein immunostaining, mitotic index, and other clinicopathologic variables. *Hum Pathol.* Nov;27(11):1124-34, 1996.

9. Solcia E, Capella C, Buffa *et al.*

The contribution of immunohistochemistry to the diagnosis of neuroendocrine tumors. *Semin Diagn Pathol.* Nov;1(4):285-96, 1984.

10. Shimizu K, Namimatsu S, Kitagawa W, *et al.*

Immunohistochemical, biochemical and immunoelectron microscopic analysis of antigenic proteins on neuroendocrine cell tumors using monoclonal antibody HISL-19. *J Nippon Med Sch.* Aug;69(4):365-72, 2002.

11. Grimelius L.

A silver nitrate stain for  $\alpha_2$  cells in human pancreatic islets. *Acta Societatis Medicorum Uppsaliensis*; 75:243-70, 1968.

12. Masson P.

La glande endocrine de l'intestin chez l'homme, Comptes Rendus de l'Académie des Sciences; 158 : 52-61, 1914.

13. Wick MR.

Immunohistology of neuroendocrine and neuroectodermal tumors. *Semin Diagn Pathol.* Aug;17(3):194-203, 2000. Review.

14. Rode J, Dhillon AP, Doran JF, Jackson P, Thompson RJ

PGP 9.5, a new marker for human neuroendocrine tumours. *Histopathology* 9:147-58, 1985.

15. Baudin E, Bidart JM, Bachelot A, et al.

Impact of chromogranin A measurement in the work-up of neuroendocrine tumors. *Ann Oncol* 12 Suppl 2:S79-82, 2001.

16. Rusch VW, Klimstra DS, Venkatraman ES Molecular markers help characterize neuroendocrine lung tumors. *Ann Thorac Surg* 62:798-809, 1996.

17. Rorstad O.

Prognostic indicators for carcinoid neuroendocrine tumors of the gastrointestinal tract. *J Surg Oncol.* Mar 1;89(3):151-60, 2005. Review.

18. Tisell LE, Oden A, Muth A, et al.

The Ki67 index a prognostic marker in medullary thyroid carcinoma. *Br J Cancer.* Dec 1;89(11):2093-7, 2003.

19. Lin O, Olgac S, Green I, Zakowski MF, Klimstra DS.

Immunohistochemical staining of cytologic smears with Mib-1 helps distinguish low-grade from high-grade neuroendocrine neoplasms. *Am J Clin Pathol*. Aug; 120(2):209-16, 2003.

20. Gentil Perret A, Mosnier JF, Buono JP, *et al*.

The relationship between MIB-1 proliferation index and outcome in pancreatic neuroendocrine tumors. *J Clin Pathol*. Mar;109(3):286-93, 1998.

21. Bajetta E, Catena L, Procopio G, *et al*.

Is the new WHO classification of neuroendocrine tumours useful for selecting an appropriate treatment? *Annals of Oncology* Jun 6, 2005.

22. Moertel CG, Kvols LK, O'Connell MJ, Rubin J.

Treatment of neuroendocrine carcinomas with combined etoposide and cisplatin. Evidence of major therapeutic activity in the anaplastic variants of these neoplasms. *Cancer*. Jul 15;68(2):227-32, 1991.

23. Lamberts SW, van der Lely AJ, de Herder WW, Hofland LJ.

Somatostatin analogs: future directions. *Metabolism*. Aug;45(8 Suppl 1):104-6, 1996.

24. de Herder WW, Hofland LJ, van der Lely AJ, Lamberts SW.

Somatostatin receptors in gastroentero-pancreatic neuroendocrine tumours. *Endocr Relat Cancer*. Dec;10(4):451-8, 2003. Review.

25. Janson ET, Oberg K.

Neuroendocrine tumors - somatostatin receptor expression and somatostatin analog treatment. *Cancer Chemother Biol Response Modif.* 21:535-46, 2003.  
Review.

26. Rindi G, Azzoni C, La Rosa S, *et al.*

ECL cell tumor and poorly differentiated endocrine carcinoma of the stomach: prognostic evaluation by pathological analysis. *Gastroenterology.* Mar;116(3):532-42, 1999.

27. Oberdorfer S.

Karzinome tumoren des Dunndarms. *Frankf Z Path;* 1:426-432, 1907.

28. Williams ED, Sandler M.

The classification of carcinoid tumours. *Lancet.* Feb 2;1:238-9, 1963

29. Volante M, Bozzalla-Cassione F, Papotti M.

Somatostatin receptors and their interest in diagnostic pathology.

*Endocr Pathol.* 2004 Winter;15(4):275-91. Review.

30. Travis WD, Gal AA, Colby TV, Klimstra DS, Falk R, Koss MN.

Reproducibility of neuroendocrine lung tumor classification.

*Hum Pathol.* 1998 Mar;29(3):272-9.

31. Megyesi M, Berta M, Khor A.

Endobronchial large cell neuroendocrine carcinoma. *Pathol Oncol Res.* 2003;9(3):198-200. Epub 2003 Oct 7.

32. Dadmanesh F, Sekihara T, Rosai J.

Histologic typing of thymoma according to the new World Health Organization classification. *Chest Surg Clin N Am.* May;11(2):407-20,2001. Review.

33. Sobin LH.

Histological typing of thyroid *tumours*. *Histopathology.* 1990 May;16(5):513.

34. Tisell LE, Oden A, Muth A, *et al.*.

The Ki67 index; a prognostic marker in medullary thyroid carcinoma. *Br J Cancer.* Dec 1;89(11):2093-7, 2003.

35. Salmenkivi K, Heikkila P, Haglund C, Louhimo J, Arola J.

Lack of histologically suspicious features, proliferative activity, and p53 expression suggests benign diagnosis in pheochromocytomas. *Histopathology.* Jul;43(1):62-71, 2003.

36. Van Eeden S, Quaadvlieg PF, Taal BG, Offerhaus GJ, Lamers CB, Van Velthuysen ML.

Classification of low-grade neuroendocrine tumors of midgut and unknown origin. *Hum Pathol.* Nov;33(11):1126-32, 2002.

37. Gentil Perret A, Mosnier JF, Buono JP, *et al.*



The relationship between MIB-1 proliferation index and outcome in pancreatic neuroendocrine tumors. *Am J Clin Pathol.* Mar;109(3):286-93, 1998.